

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

Efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Piura, Perú, 2018.

PRESENTADA POR:

Br. Nori Luciana Avila Carmen.

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIOLOGO

Línea de investigación:

Salud Pública

Piura, Perú

Año 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

Efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Piura, Perú, 2018.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Salud Pública

Presentada por:

Br. Nori Luciana Avila Carmen.

EJECUTORA

Mclgo. María Dorothy Torres Gallo, M. Sc.

ASESORA

Mclgo. Rosario Fiestas Chunga.

COASESORA

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS

Yo: Nori Luciana Avila Carmen identificada con DNI N° 71479023, Bachiller de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, de la Facultad de Ciencias y domiciliado en Av. Progreso N° 520 del Distrito de Castilla Provincia de Piura y Departamento de Piura con Celular 961992967 y Email: lucianaavila512@gmail.com

DECLARO BAJO JURAMENTO: que la tesis que presento es original e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada, y/o realizada en el Perú o en el Extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código Penal concordante con el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.

Piura, 14 de agosto del 2019


DNI N° 71479023



Artículo 411.- El que, en un procedimiento administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos o circunstancias que le corresponde probar, violando la presunción de veracidad establecida por ley, será reprimido con pena privativa de libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art. 4. Inciso 4.12 del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales- RENATI Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



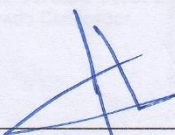
TESIS

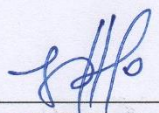
Efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Piura, Perú, 2018.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Salud Pública

Revisada por:


Moblgo. Cesar Augusto Torres Díaz, M. Sc.
PRESIDENTE DE JURADO


Moblgo. Jorge Luis Bermejo Benites
SECRETARIO DE JURADO


Moblgo. Jaime N. Fernández Ponce, M. Sc.
VOCAL DE JURADO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA FACULTAD DE CIENCIAS



ACTA DE SUSTENTACIÓN 049 - 2019-UI-FC-UNP

FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada "EFECTO INHIBITORIO DE *Lactobacillus* sp. SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 Y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, PIURA, PERÚ, 2018", presentada por la señorita Bachiller **NORI LUCIANA AVILA CARMEN**, con el asesoramiento del **Mcbigo. María Dorothy Torres Gallo, MS.c.**, y co-asesora **Mcbigo. Rosario Fiestas Chunga**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, la declaran:

APROBADA ☒

DESAPROBADA ☐

Con la mención de:

Muy bueno

☒ En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

☒ En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que la sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 14 de agosto de 2019.


Mcbigo. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ, MS.c.
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS


Mcbigo. JORGE LUIS BERMEJO BENITES
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS


Mcbigo. JAIME NAPOLEÓN FERNÁNDEZ PONCE
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla
PIURA - PERU

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
CAPÍTULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA	16
1.1 Descripción de la realidad problemática	16
1.2 Justificación e importancia de la investigación	16
1.3 Objetivos	16
1.3.1 Objetivo general	16
1.3.2 Objetivos específicos	16
1.4 Delimitación de la investigación	17
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	18
2.1 Antecedentes de la investigación	18
2.2 Bases teóricas	19
2.2.1 Probióticos	19
2.2.2 Bacterias Acido Lácticas	19
2.2.3 <i>Lactobacillus sp.</i>	20
2.2.4 Enfermedades de Transmisión Alimentaria	20
2.2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.2.6. <i>Salmonella sp.</i>	21
2.3 Glosario de términos básicos	22
2.4 Hipótesis	23
2.4.1 Hipótesis general	23
2.4.2 Hipótesis específicas	23
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	24
3.1 Enfoque y diseño	24
3.2 Sujetos de la investigación	24
3.3 Métodos y procedimientos	24
3.3.1 Aislamiento e identificación de <i>Lactobacillus sp.</i>	24
3.3.2 Confirmación de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.	26

3.3.3 Confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	27
3.3.4 Enfrentamiento de <i>Lactobacillus sp.</i> con <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	27
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1 Resultados	29
4.2 Discusión	35
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Cuadro 4.1.1: Resultado de la medida de los halos de inhibición formados después de realizar el enfrentamiento de <i>Lactobacillus sp.</i> con <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	29
Cuadro 4.1.2: Aislamiento de <i>Lactobacillus sp.</i> a partir de macerado de cebada.	32
Cuadro 4.1.3: Resultado de la tinción de Gram de las placas LD3, LD4 y LD5 por duplicado.	32
Cuadro 4.1.4: Resultado de la prueba de la catalasa utilizando peróxido de hidrogeno al 30% (H ₂ O ₂) en las placas LD3, LD4 y LD5.	32
Cuadro 4.1.5: Resultado de la prueba de la oxidasa haciendo uso de tiras indicadoras Microbiology Bactident® Oxidase en las placas LD3, LD4 y LD5.	32
Cuadro 4.1.6: Resultado de la prueba de producción de gas a partir de glucosa en las placas LD3, LD4, y LD5 (duplicado).	32
Cuadro 4.1.7: Resultado de la prueba de tolerancia a pH ácido en la placa LD3.	33
Cuadro 4.1.8: Resultado de la prueba tolerancia a tres concentraciones diferentes de NaCl en la placa LD3.	33
Cuadro 4.1.9: Confirmación de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 por pruebas bioquímicas.	33
Cuadro 4.1.10: Confirmación de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 en medio de cultivo sólido.	34
Cuadro 4.1.11: Confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por la prueba de la coagulasa.	34
Cuadro 4.1.12: Confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en medio de cultivo agar Baird Parker.	34
Cuadro 4.1.13: Medida de los halos de inhibición (mm) del control positivo.	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 01: Prueba 01 del enfrentamiento de <i>Lactobacillus sp.</i> con <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	30
Gráfico 02: Prueba 02 del enfrentamiento de <i>Lactobacillus sp.</i> con <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	30
Gráfico 03: Prueba 03 del enfrentamiento de <i>Lactobacillus sp.</i> con <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	31
Gráfico 04: Comparación de la medida de los halos de inhibición (cm).	31

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 01: Preparación del macerado de cebada.	41
Anexo 02: Observación de bacilos Gram positivos después de realizar la tinción de Gram.	42
Anexo 03: Observación de la placa LD3 de <i>Lactobacillus sp.</i> en medio sólido agar MRS a partir del macerado de cebada.	43
Anexo 04: Comparación de las colonias de <i>Lactobacillus sp.</i> en agar MRS.	43
Anexo 05: Cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 del Laboratorio Referencial de Salud (LARESA).	44
Anexo 06: Confirmación bioquímica de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.	44
Anexo 07: Confirmación bioquímica de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	46
Anexo 08: Control Positivo en <i>Salmonella typhimurium</i> 14028 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592.	47
Anexo 09: Enfrentamiento de <i>Lactobacillus sp.</i> con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	48
Anexo 10: Enfrentamiento de <i>Lactobacillus sp.</i> con <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.	49
Anexo 11: Fórmula del medio Agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) para el aislamiento de <i>Lactobacillus sp.</i>	50
Anexo 12: Fórmula del medio Agar Baird Parker para el aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	50
Anexo 13: Fórmula del medio Agar Salmonella Shiguelia para el aislamiento de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.	50

DEDICATORIA

Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas.

Josué 1:9

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser lo más importante en mi vida, darme siempre la oportunidad de superarme cada día y ser mi fortaleza en momentos de debilidad.

A mis padres por el apoyo brindado todo este tiempo, por haber hecho de mí una persona con valores y principios, a mi madre por ser ejemplo de sacrificio y esfuerzo constante.

A mi esposo Miguel por su apoyo y amor incondicional, y el esfuerzo que hace día a día en darle lo mejor a nuestra familia.

A mi hija Alessandra por ser mi mayor motivación, quién renueva mis fuerzas cuando todo se hace complicado, y a mi bebé en camino porque será un gran motivo para seguir dando lo mejor de mí siempre, y por ser ambos lo que más amo en el mundo.

A mis hermanos Mariella, Pierre y Fabián por darme palabras de ánimo para seguir adelante, y a mis sobrinos Ismael, Matteo y Annia por ser tan importantes en mi vida.

A mí asesora M^cblgo. María Dorothy Torres Gallo por el apoyo constante, por sus amplios conocimientos y su paciencia para orientarme en este largo camino para conseguir los mejores resultados.

A la Dra. Rosario Fiestas Chunga por brindarme las facilidades para poder realizar mi proyecto de tesis de la mejor manera en el Laboratorio de Microbiología del Laboratorio Referencial de Salud (LARESA) junto a todo el gran equipo que ahí labora.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para ello se procedió a aislar *Lactobacillus sp.* a partir de la preparación de macerado de cebada realizándose el malteado, secado y maceración de la cebada manejando tiempos y temperaturas adecuadas para obtener dicho macerado; luego se realizaron diluciones sucesivas hasta 10^{-5} y se sembró en placas con agar MRS; de las placas con crecimiento de colonias sospechosas se sembró por duplicado en placas con agar MRS y posteriormente se realizó el aislamiento de presuntas colonias de *Lactobacillus sp.* a las cuales se les hizo tinción de Gram así como pruebas bioquímicas: prueba de catalasa, oxidasa, producción de gas a partir de glucosa, tolerancia a pH ácido y tolerancia a tres concentraciones diferentes de NaCl, comprobándose bacterias del género *Lactobacillus* con perfil bioquímico de *Lactobacillus delbrueckii*. Finalmente se realizó el enfrentamiento de dicho microorganismo con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, observándose como resultado el efecto inhibitorio con la formación de halos de inhibición con diámetros de hasta 2.1 y 2.7 cm respectivamente.

Palabras claves: Cebada, *Lactobacillus delbrueckii*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the inhibitory effect of *Lactobacillus sp.* on the growth of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. For this purpose *Lactobacillus sp.* from macerated barley, malting, drying and maceration of the barley being carried out, handling adequate times and temperatures to obtain said maceration; then successive dilutions were made up to 10^{-5} and seeded on plates with MRS agar; of the plates with growth of suspicious colonies were seeded in duplicate in plates with MRS agar and subsequently the isolation of suspected colonies of *Lactobacillus sp.* which were stained with Gram as well as biochemical tests: catalase test, oxidase, gas production from glucose, tolerance to acidic pH and tolerance to three different concentrations of NaCl, proving bacteria of the genus *Lactobacillus* with biochemical profile of *Lactobacillus delbrueckii*. Finally, the confrontation of said microorganism was performed with *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, observing as a result the inhibitory effect with the formation of inhibition halos with diameters of up to 2.1 and 2.7 cm respectively.

Key words: Barley, *Lactobacillus delbrueckii*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen numerosas investigaciones acerca de las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales generalizan a un grupo de bacterias que fermentan azúcares como glucosa y lactosa para producir ácido láctico. Dentro de este grupo se encuentran microorganismos aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos, donde se encuentra: *Lactobacillus sp*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus* (Benites, 2015).

Las BAL poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos. Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, desarrollo a diferentes temperaturas, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal y tolerancia a la alcalinidad y acidez (Ramírez, 2010).

Las bacterias ácido lácticas se pueden encontrar como microbiota natural en la leche, carnes y hortalizas, y cuando desdoblan sus carbohidratos como fuente de carbono producen una serie de metabolitos como ácidos orgánicos, peróxidos, péptidos de bajo peso molecular, ácido láctico y bacteriocinas de gran importancia en el control de microorganismos indeseables en los alimentos, los cuales actúan como agentes antimicrobianos (Benites, 2015).

El género *Lactobacillus* comprende a bacterias de forma bacilar, comúnmente asociadas en cadenas cortas, anaerobias facultativas o microaerofilas, catalasa y citocromo negativos. Excepcionalmente pueden poseer motilidad por flagelos peritricos, son quimioorganotróficos, necesitan medios complejos para su crecimiento. La temperatura óptima de crecimiento de los lactobacilos oscila entre 30-40 °C. El lactobacilo se caracteriza por tener forma de cilindros alargados, rectos o curvos. Su longitud puede variar desde 0.5 hasta 6 µm (Benites, 2015).

Este grupo de microorganismos tiene un metabolismo fermentativo que produce ácido láctico como el producto final de la fermentación de los azúcares como glucosa y lactosa; por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (glucólisis) y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6- Fosfogluconico. Requieren para su desarrollo de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas, por esta razón son tan abundante en la leche y sus derivados. Se pueden clasificar según el tipo de fermentación que realizan como homofermentativos y heterofermentativos (Ramírez, 2010).

La capacidad antagónica de las BAL, y por ende de *Lactobacillus sp*. frente a microorganismos patógenos, es atribuida a sus productos metabólicos, ya que al fermentar los hidratos de carbono producen una amplia variedad de sustancias de acción antimicrobiana como el ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas. Sin embargo, también se puede dar una actividad por la competencia por los nutrientes del ambiente en que se encuentran (Ramírez, 2010).

La producción de ácido láctico hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias dañinas. Algunas especies de *Lactobacillus* son usadas industrialmente para la producción de yogur y otros alimentos fermentados de origen vegetal (Tito y Viloche, 2009).

Los ácidos acético y propiónico producidos a través de la vía heterofermentativa pueden interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas; estos compuestos antimicrobianos son más efectivos que el ácido láctico debido a los elevados valores de pKa (ácido láctico 3.08, ácido propiónico 4.87 y ácido acético 4.75); por lo tanto, tienen un mayor rango de actividad antimicrobiana contra levaduras, mohos y bacterias. Al mismo tiempo, se ha observado que el ácido acético es más efectivo contra el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y la germinación de *Bacillus cereus* que los ácidos láctico y cítrico; y que el crecimiento de *S. typhimurium* se reduce cuando se utiliza a los ácidos láctico y acético combinados, lo que demuestra su actividad sinérgica (Bustamante y Alvarado, 2015).

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es producido en presencia de oxígeno por las BAL a través de la acción de flavoproteína oxidasa o NADH peroxidasa y su efecto antimicrobiano se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilo causando la desnaturalización de enzimas, el H_2O_2 producido por *Lactobacillus* y *Lactococcus* es capaz de inhibir cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.* y varios microorganismos psicrótrofos en alimentos (Bustamante y Alvarado, 2015).

Los lactobacilos también producen bacteriocinas, que son proteínas o complejos de proteínas que actúan formando poros en la membrana citoplasmática, provocando la salida rápida de metabolitos requeridos para la biosíntesis de la célula. En efecto, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica (Bustamante y Alvarado, 2015).

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son causadas principalmente por *Salmonella* y *Staphylococcus* y sus características patogénicas, modos de transmisión y alimentos en los cuales se encuentran, han sido ampliamente documentados; así como la importancia de *Lactobacillus* como agente antimicrobiano de microorganismos patógenos, entre ellos *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*, considerados de gran importancia en la salud pública debido a los brotes de infecciones e intoxicaciones generados por el consumo de alimentos contaminados con estas bacterias (Bustamante y Alvarado, 2015).

Debido a que no existen estudios en la región Piura, acerca de microorganismos del género *Lactobacillus* aislados a partir del macerado de cebada es que se realizó la presente investigación orientada a determinar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en el Laboratorio Referencial de Salud Pública de Piura buscando de esta manera una estrategia natural para combatir bacterias patógenas transmitidas por alimentos debido a la creciente resistencia a los antibióticos por parte de éstas y al aumento de enfermedades causadas por dichas bacterias a nivel mundial.

CAPÍTULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA

1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Desde hace muchos siglos, los microorganismos probióticos han sido utilizados de forma empírica, en la producción de alimentos como por ejemplo diversos productos lácticos y vegetales fermentados. Estos alimentos aportan características organolépticas, en base a la presencia de determinados microorganismos. En los últimos años se ha mostrado un interés específico sobre estos microorganismos debido a que su utilización puede mejorar la salud y prevenir enfermedades (Rodríguez, 2009).

Existen hoy en día gran número de microorganismos capaces de ocasionar daño en los seres humanos, causando enfermedad e incluso la muerte, pero a la vez están los que al ser ingeridos en cantidades adecuadas y necesarias, son capaces de mejorar la salud de las personas realizando un papel antagónico frente a los mencionados inicialmente; en esta investigación se buscó determinar si *Lactobacillus sp.* tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 representando así una potencial alternativa para inactivar a ciertos patógenos perjudiciales para la salud de los seres humanos.

1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló por la necesidad de conocer cuál fue el efecto que produce *Lactobacillus sp* frente a las bacterias patógenas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, las cuales están estrechamente relacionadas principalmente con las ETAs (Enfermedades transmitidas por alimentos) u otras enfermedades que pueden provocar graves problemas a la salud de las personas e incluso la muerte; algunas especies del género *Lactobacillus* como *Lactobacillus delbrueckii* poseen propiedades probióticas las cuales contribuyen en la biopreservación de los alimentos mejorando sus características como el olor, el sabor y su aporte nutricional beneficiando así la salud de los seres humanos.

Según la base de datos de la Dirección de Laboratorios de salud pública Piura que pertenece a la Dirección Regional de Salud de Piura, no existen estudios del aislamiento de *Lactobacillus sp.* a partir de productos vegetales como la cebada macerada, que al ser enfrentados a patógenos como *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se observe la inhibición de su crecimiento, posiblemente a futuro se pueda adicionar microorganismos pertenecientes al grupo de *Lactobacillus* que presenten dicho efecto frente a microorganismos patógenos en los insumos utilizados para la preparación de alimentos o al alimento preparado directamente y dar un valor agregado, mejorando los procesos y aumentando la estabilidad y el tiempo de conservación de los alimentos que son para el consumo humano finalmente.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Determinar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.3.2 Objetivos específicos

Aislar e identificar *Lactobacillus sp* en cultivo puro a partir de la preparación de macerado de cebada.

Verificar las cepas referenciadas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Determinar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.4 DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El presente estudio se realizó dentro de las instalaciones de la Dirección de Laboratorios de Salud Pública Piura, específicamente en el laboratorio de microbiología, el cual pertenece al Equipo de Control de Calidad de Alimentos y Vigilancia Nutricional (ECCAVN) del Laboratorio Referencial de Salud Piura (LARESA), ubicado en la Av. Ramón Castilla 373, Castilla, Piura.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

En una investigación en la ciudad de Trujillo, Perú, se determinó el efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus sp.* aislado a partir de heces de neonatos sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*. Se encontró que cinco de los cultivos de *Lactobacillus sp.* presentaron evidente capacidad antagónica, ya que inhibieron todos los patógenos evaluados, mientras que el cultivo de *S. aureus* presentó resistencia frente a dos de los cultivos de *Lactobacillus sp.* Se concluye que el sobrenadante de los siete cultivos de *Lactobacillus sp.* aislados de heces de neonatos presentó efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*, pero dos de estos no tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Bustamante y Alvarado, 2015).

En otra investigación en el Departamento de La Libertad, Perú, se determinó el efecto *in vitro* del sobrenadante de cultivos de *Lactobacillus sp.* aislados de leche materna, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* Se determinó que los cultivos de *Lactobacillus sp.* aislados de leche materna tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* (Benites, 2015).

Se evaluó el potencial probiótico de 60 cultivos de *Lactobacillus sp.* y 60 de *Streptococcus sp.* aislados de queso preparado artesanalmente en la región La Libertad, Perú. Se analizó la tolerancia a pH ácido y sales biliares, la producción de hemolisinas, la coagulación de la leche, la actividad antimicrobiana, las características físico-químicas de las bacteriocinas “crudas” y el efecto de la concentración (título) de las bacteriocinas “crudas” de los cultivos en estudio sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y *Salmonella sp.* Se encontró que 27 cultivos de *Lactobacillus sp.* mostraron tolerancia a la acidez (pH 2,5) y sales biliares (0,3%), no producen hemolisinas y coagulan la leche. Respecto al aislamiento y selección de *Streptococcus sp.* se encontró que 10 cultivos mostraron tolerancia a la acidez (pH 2,5) y sales biliares (0,3%), no producen hemolisinas y coagulan la leche. Se concluyó que dichas bacterias seleccionadas presentaron características para ser consideradas como cultivos potencialmente probióticos (Rodríguez, 2010).

En Argentina se realizó un estudio para evaluar la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus spp.* frente a patógenos implicados en enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*. Para ello se tomaron muestras de las distintas etapas de la cadena de producción porcina. De dichas muestras se aislaron en total 78 cepas bacterianas, de las cuales 27 (34,61%) tuvieron características fenotípicas y genotípicas correspondientes al género *Lactobacillus spp.*; el 85,18% de ellas presentó capacidad inhibitoria frente a por lo menos una de las cepas patógenas evaluadas (Colello et al., 2017).

En Bogotá, Colombia se realizó la evaluación *in vitro* de la posible actividad antagónica de las cepas de *Lactobacillus sp.* aisladas a partir de productos lácteos, la capacidad antagónica se realizó mediante el ensayo de Ritter enfrentando las cepas aisladas a cuatro microorganismos patógenos y alteradores en productos lácteos como *Salmonella typhi*, *E.coli* ATCC 8739, *Penicillium sp* y *Aspergillus niger*. Como resultado de estos procesos se encontraron 6 cepas diferentes de *Lactobacillus s.p.*, que no presentaron una actividad antagónica importante contra las cepas evaluadas (Ramírez, 2010).

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 Probióticos

Desde hace muchos siglos, los microorganismos probióticos han sido utilizados de forma empírica, en la producción de alimentos como por ejemplo diversos productos lácticos y vegetales fermentados. Estos alimentos aportan características organolépticas en base a la presencia de determinados microorganismos. En los últimos años se ha mostrado un interés específico sobre estos microorganismos debido a que su utilización puede mejorar la salud y prevenir enfermedades (Rodríguez, 2009).

El termino probiótico tiene procedencia griega y literalmente significa “a favor de la vida”. Fue utilizado por primera vez en 1965 por Lilley y Stillwell para definir a las sustancias procedentes del metabolismo microbiano que promueven el crecimiento de otros microorganismos (Torres, 2013).

En 1974 la definición anterior fue modificada para ampliarla y abordar no solo a las sustancias de secreción sino también incluir a los organismos que contribuyen al equilibrio intestinal microbiano. Posteriormente, la definición se sujetó a varias modificaciones hasta que finalmente la FAO y la OMS proponen la siguiente definición: “Se define como probióticos a todos los organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable al huésped” (Torres, 2013).

Los probióticos tienen diferentes efectos benéficos en el ser humano, es así que modifican la microflora intestinal, influyen directa e indirectamente en el estado de salud a través de la producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta que colaboran con la degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulan la respuesta inmune y dan protección frente a microorganismos enteropatógenos (Torres, 2013).

2.2.2 Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan un alto potencial biotecnológico, dada su presencia en diversos procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano y animal. Estas bacterias no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas de los alimentos, sino que generan ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos, debido a su marcada capacidad antagonista. Además de este importante papel en procesos de bioconservación, se ha comprobado que algunas cepas de bacterias lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, son beneficiosas para la salud tanto humana como animal (Bocourt et al., 2008).

Como indica el nombre genérico, estas bacterias son de morfología bacilar variando su longitud y grosor. La mayoría de las especies son homofermentadoras pero algunas son heterofermentadoras. Son comunes en todo tipo de lácteos. Por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* se usa en la producción de yogur, *L. acidophilus* en la producción de leche ácida y otras especies en la producción de encurtidos, ensilado y pepinillos ácidos. Los lactobacilos son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer hasta pH 4. Por ello, son fáciles de aislar de una gran cantidad de hábitats por selección directa en medios, conteniendo azúcares y ácidos, como es el caso de zumo de tomate peptona agar. Esta resistencia al pH les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, aun cuando el pH haya caído tanto que otras bacterias lácticas ya no pueden crecer. Por ello, las lactobacterias son las responsables siempre de terminar la inmensa mayoría de las fermentaciones lácticas. No son patógenos (Madigan et al., 2004).

Algunas especies de *Lactobacillus* son usadas industrialmente para la producción de yogur y otros alimentos fermentados. Algunas bebidas de yogur contienen *Lactobacillus* como suplemento dietético. Muchos lactobacilos son los únicos seres vivos que no requieren hierro

para vivir y tienen una tolerancia extremadamente alta al peróxido de hidrógeno (Tito y Viloche, 2009).

Exhiben un crecimiento óptimo en condiciones ácidas ligeramente más bajas (pH 5.5 - 6.0) mientras que el crecimiento es a menudo restringido en condiciones neutras o algo alcalinas (pH superior a 7,0 a 7,5). Son estrictamente fermentativos, con ácido láctico como producto final principal durante la fermentación del azúcar. Las BAL pueden clasificarse en función de su morfología (cocos o varillas, tétrada), modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas y concentraciones de sal, y configuración de producción de ácido láctico (D, L o ambos). Tienen dos vías metabólicas diferentes para la fermentación de hexosa. En vía homofermentativa, ácido láctico (más del 85%) es el producto final principal, mientras que en la vía heterofermentativa el ácido láctico, el etanol, acetona y el CO₂ son los productos terminales (Khalil, 2016).

2.2.3 *Lactobacillus sp.*

El género *Lactobacillus* constituyen un grupo de microorganismos GRAS “generalmente reconocido como seguros” (Generally Recognized as Safe, GRAS) que tienen la capacidad de producir ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Es un microorganismo probiótico debido que tiene características que favorece la salud humana, no tiene efectos negativos, es decir, es inocuo. Se encuentran en grandes cantidades en plantas, animales y en el ser humano, en especial en el tracto digestivo (Benites, 2015).

El crecimiento es óptimo a pH 5.5 – 5.8, pero resisten mejor las condiciones de acidez que otras bacterias ácido lácticas. Tienen requerimientos nutricionales complejos: aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, especialmente B, minerales, ácidos grasos y carbohidratos (Benites, 2015).

El efecto antimicrobiano de *Lactobacillus sp.* contra otras bacterias se conoce desde hace muchos años. Metchnikof señalaba que una flora nativa intestinal estable, regula la toxemia crónica natural que tiene un papel primordial en el envejecimiento y muerte. Así mismo la competencia por sustratos, los sitios de colonización y los productos de la fermentación, resultan inhibitorios para muchos patógenos (Benites, 2015).

A pesar de la utilidad que *Lactobacillus* tienen en la industria, es difícil cultivarlas por la necesidad de una gran cantidad de requerimientos nutricionales. Se utilizan varios medios de cultivo (selectivos o diferenciales) para el aislamiento y recuento de estos microorganismos a partir de alimentos, entre los que se encuentran agar MRS (Man-Rogosa-Sharpe); agar APN (Actidiona-polimixina-nitrito); agar de Lee y el agar de Chalmers (Benites, 2015).

2.2.4 Enfermedades de Transmisión Alimentaria

Hoy en día se conoce que las enfermedades de transmisión alimentaria abarcan un amplio espectro de dolencias y constituyen un problema de salud pública creciente en todo el mundo. Se deben a la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas. La contaminación de los alimentos puede producirse en cualquier etapa del proceso que va de la producción al consumo de alimentos ("del campo a la mesa") y puede deberse a la contaminación ambiental, ya sea del agua, la tierra o el aire. La manifestación clínica más común de una enfermedad transmitida por los alimentos consiste en la aparición de síntomas gastrointestinales, pero estas enfermedades también pueden dar lugar a síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos y de otro tipo. La ingestión de alimentos contaminados puede provocar una insuficiencia multiorgánica, incluso cáncer, por lo que representa una carga considerable de discapacidad, así como de mortalidad. Las regiones de África y Asia Sudoriental según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015), tienen la carga más alta de enfermedades de transmisión alimentaria.

Casi un tercio (30%) de todas las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria se producen en niños menores de 5 años, pese a que los niños de esa edad representan solo 9% de la población mundial. Esta es una de las conclusiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el informe *Estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria*, el más completo publicado hasta la fecha sobre el impacto de los alimentos contaminados en la salud y el bienestar. Según el informe, en el cual se presenta una estimación de la carga de las enfermedades de transmisión alimentaria causadas por 31 agentes (bacterias, virus, parásitos, toxinas y productos químicos), cada año hasta 600 millones de personas de todo el mundo, o casi 1 de cada 10, enferman tras consumir alimentos contaminados. De estas personas, 420.000 mueren, incluidos 125.000 niños menores de 5 años. (OMS, 2015).

Se consideran ETA (enfermedades de transmisión alimentaria) todas aquellas enfermedades causadas por la ingestión de agua o alimentos contaminados que provocan un efecto nocivo en la salud del consumidor, o de un grupo de consumidores, en forma aguda o crónica. Pueden ser causadas por patógenos, sustancias químicas o parásitos que contaminan los alimentos en distintos puntos de la cadena de producción. Las bacterias generalmente implicadas en ETA corresponden a las especies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Listeria monocytogenes* o a los géneros *Salmonella*, *Campylobacter* y *Shigella* (Colello et al., 2017).

2.2.5. *Staphylococcus aureus*

En los alimentos ocasionalmente se encuentran microorganismos patógenos para el hombre y los animales. Su consumo puede ocasionar un proceso infeccioso cuando el microorganismo es ingerido viable y en número suficiente en el alimento. Entre los microorganismos de importancia para la salud pública tenemos el género *Staphylococcus* que se presenta en forma de racimos de uvas, en parejas o en formas de cadenas cortas. *S. aureus* es la especie más importante del género, es un coco Gram positivo aerobio o anaerobio facultativo que produce fermentación láctica, es catalasa y coagulasa positivo. Esta bacteria se puede encontrar en alimentos crudos, equipos o manipuladores y puede pasar a otros alimentos por contaminación cruzada, si bien necesita multiplicarse hasta alcanzar concentraciones de 10^5 ufc/g para producir la toxina y provocar la enfermedad (Benites, 2015).

Por otro lado, una de las intoxicaciones alimentarias que se presentan con mayor frecuencia es la originada por la ingestión de la enteroxina que se forma en los alimentos cuando en ellos se multiplican ciertas cepas de *Staphylococcus aureus*. La toxina recibe la denominación de enterotoxina estafilocócica entérica la cual produce gastroenteritis o inflamación de la mucosa que reviste el tracto gastrointestinal (Benites, 2015).

La especie *Staphylococcus aureus* que pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, es la que causa mayor cantidad de infecciones en el ser humano. Suele estar presente en la piel y en las membranas mucosas, sin causar infección. La intoxicación en el hombre se produce por la multiplicación y producción de enterotoxinas termorresistentes en los alimentos consumidos. En la cadena de producción de alimentos existen riesgos de infección por patógenos, por lo que se necesita un control microbiológico estricto para impedir que estos lleguen al consumidor. Para inactivar estas bacterias se han estudiado diversas estrategias, como, por ejemplo, sistemas de biopreservación, tecnologías no térmicas o combinaciones de aquellas. El empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) o de sus metabolitos son ejemplos de tratamientos de biopreservación. Las BAL son consideradas seguras y se utilizan en muchos países en la producción de alimentos fermentados. Por esta razón son sumamente atractivas como herramientas para controlar el crecimiento de patógenos en una gran variedad de alimentos (Colello et al., 2017).

2.2.6. *Salmonella sp.*

Salmonella spp. es un agente productor de zoonosis cuyo hábitat natural normalmente es el tracto gastrointestinal de los mamíferos y las aves. Se transmite por contacto directo o

contaminación cruzada durante la manipulación y el procesado de los alimentos, en el hogar o a través del agua (Colello et al., 2017).

Salmonella es sensible al calor y muere por calentamiento (mayor a los 70°C). Los alimentos crudos o que hayan sufrido una media cocción, además de la contaminación cruzada que ocurre cuando los productos cocidos entran en contacto con los materiales crudos o contaminados (como las tablas para cortar), son las principales causas de infección. Por lo tanto, la cocción adecuada y la higiene durante la manipulación de los alimentos pueden prevenir en gran medida las infecciones causadas por *Salmonella* (Benites, 2015).

La salmonelosis se trata de una infección de origen bacteriano transmitida por los alimentos y el agua que han sido expuestos al microorganismo por una contaminación cruzada o directa. El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, consiste en bacilos Gram negativos que fermentan la glucosa, generalmente con producción de gas, pero normalmente no fermentan la lactosa ni la sacarosa. Son organismos no esporulados, aerobios o facultativos, catalasa positiva, oxidasa negativa y son móviles por flagelos peritricos. Tienen una temperatura de crecimiento de 5°C hasta 47°C con un crecimiento óptimo de 37°C. Las especies del género *Salmonella* son resistentes a la congelación y la deshidratación, pero son termosensibles y se destruyen fácilmente por temperaturas de pasteurización (Benites, 2015).

2.3 GLOSARIO DE TÉRMINOS BÁSICOS

Agar MRS: El Agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, medio de cultivo apropiado para el aislamiento y recuento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas a partir de muestras clínicas y alimentos (especialmente productos lácteos).

Agar Tripticasa Soya (TSA): Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos y estrictos.

Caldo MRS: El Caldo M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, es un medio de cultivo apropiado para el enriquecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas a partir de muestras clínicas y alimentos (especialmente productos lácteos).

Cepas referenciadas ATCC: Las cepas ATCC (American Type Culture Collection) son microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología y es utilizado en disciplinas como la clínica, alimenticia, farmacéutica, cosmética o ambiental.

Control negativo: Un control negativo es un control experimental que no da una respuesta a la prueba. El control negativo tampoco está expuesto a la prueba experimental directamente. Se realiza en paralelo al experimento como un experimento de control.

Control positivo: Un control positivo es un control experimental que da un resultado positivo al final del experimento. Este tipo de prueba siempre da buen resultado como un “sí”.

Cultivo puro: Un cultivo puro es aquel que contiene una sola clase de microorganismos. Sólo después de haber obtenido un cultivo puro se puede identificar un microorganismo y/o estudiar sus características bioquímicas o de otro tipo. La obtención de un cultivo puro se hace mediante una técnica de aislamiento.

Gentamicina: Es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro. Actúa sobre bacterias gramnegativas aerobias, incluyendo enterobacteriáceas, *Pseudomonas* y *Haemophilus*.

Halos de inhibición: Es la zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen.

Inhibición: Limita el crecimiento de los microorganismos.

Macerado de cebada: La maceración es el proceso mediante el cual el cervecero, a través de remojar el grano (principalmente de cebada) con agua a ciertas temperaturas, activa diversas enzimas de la malta para convertir los almidones en azúcares más simples, que en un proceso posterior serán metabolizados por la levadura en alcohol etílico.

Microaerofilia: La microaerofilia hace referencia a la baja concentración de oxígeno que requieren determinados microorganismos para su desarrollo.

Patógenos: Los microorganismos patógenos son aquellos que dañan la salud humana, y son principalmente bacterias, virus y protozoarios. Algunos de ellos fueron y siguen siendo causa de una elevada mortalidad.

2.4 HIPÓTESIS

2.4.1 Hipótesis general

Lactobacillus sp tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias patógenas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.4.2 Hipótesis específicas

Lactobacillus sp se puede aislar e identificar en cultivo puro a partir del macerado de cebada.

Las cepas a utilizar si corresponden a las cepas referenciadas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Lactobacillus sp tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1 ENFOQUE Y DISEÑO

Cuantitativo: Experimental

3.2 SUJETOS DE LA INVESTIGACIÓN

Lactobacillus sp.: Los lactobacilos (también *Lactobacillus* o bacterias del ácido láctico) son un género de bacterias Gram positivas anaerobias aerotolerantes, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierten la lactosa y algunos monosacáridos en ácido láctico, dando lugar a la fermentación láctica.

Salmonella typhimurium: *Salmonella enterica* subgrupo *enterica* serotipo *typhimurium* (también llamada simplemente *Salmonella typhimurium*). El nombre entérica está asociado al intestino. La salmonela es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. La causa más común del envenenamiento de comida por salmonelosis es *Salmonella typhimurium*.

Staphylococcus aureus: *Staphylococcus aureus* conocido como estafilococo áureo o estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, aunque no infectadas, por ella.

3.3 MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

3.3.1 Aislamiento e identificación de *Lactobacillus sp.*

Para el aislamiento de *Lactobacillus sp.* se preparó un macerado de cebada para lo cual se realizó lo siguiente:

Malteado: Corresponde a las primeras etapas de la germinación y su objetivo es la germinación controlada del grano de cebada mediante la cual se producen enzimas (amilasas, β - glucanasas y proteasas) que sirven para hidrolizar materiales de reserva del grano. Para ello, se empapó 500 g de cebada con 600 ml de agua y se mantuvo por 2 días a 16°C, aumentando su contenido en agua hasta un 45%. Posteriormente la cebada germinó parcialmente durante 5 días bajo condiciones controladas de temperatura y aireación.

Secado: Este proceso suele durar dos días y conlleva la disminución de la humedad hasta un 1-5%. Tiene como objetivo detener las transformaciones bioquímicas, para lo cual se utilizó calor a una temperatura menor de 60°C haciendo uso de un horno microondas en el que se colocó el depósito que contenía la cebada malteada por periodos de 30 segundos un total de 8 veces para ir secando poco a poco y se dejó por dos días a una temperatura de 45°C, así las enzimas convierten los almidones en azúcares.

Antes de la maceración se procedió al molturado (molienda de la malta) de la cebada, para lo cual se colocó dentro de una bolsa de primer uso los granos de cebada y sobre una superficie lisa se fue aplastando con un palo de amasar, para que se rompa y triture el núcleo del grano, evitando que se corte la cáscara hasta que quedó bien molido.

Maceración: La cebada malteada ya triturada se mezcló con agua a temperatura controlada de 65°C para lograr la hidrólisis de almidón por las amilasas y también de las proteínas por proteasas activadas durante la germinación. De este modo se preparó un extracto con azúcares fermentables, aminoácidos, vitaminas etc., a partir de la cebada malteada, dando lugar a lo que se conoce como mosto.

Una vez que se obtuvo el mosto se mantuvo a 45 °C durante 5 días, después de este periodo el líquido que se encontraba por encima de las partes maceradas sólidas tuvo un enturbiamiento sedoso del cual se procedió a realizar lo siguiente:

Del macerado de cebada obtenido se realizó una dilución de 10 ml de macerado en 90 ml de agua peptonada estéril, a partir de dicha dilución se continuaron realizando diluciones sucesivas sembrando 1 ml de la dilución inicial en tubos conteniendo 9 ml de agua peptonada estéril formando así diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} ; posteriormente se colocó 1 ml de cada dilución en placas de petri a las cuales se les agregó 15 ml de medio fundido agar MRS y se dejó solidificar, luego se adicionó 5 ml de agar MRS nuevamente para formar una doble capa, todo esto se realizó por duplicado obteniendo un total 10 placas. Finalmente se incubaron las placas a 37°C durante 72 horas.

Purificación de posibles cultivos puros:

De las placas que contenían la dilución 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} (por duplicado) se volvió a sembrar en agar MRS colocándoles los siguientes códigos: LD3 (placas procedentes de dilución 10^{-3}), LD4 (placas procedentes de dilución 10^{-4}) y LD5 (placas procedentes de dilución 10^{-5}) y se incubó a 37°C durante 48 horas. En todas las placas se observó el crecimiento de colonias, y se volvió a sembrar en nuevas placas que contenían agar MRS para la obtención de posibles cultivos puros de *Lactobacillus sp.* mediante la técnica de purificación por agotamiento de estría.

Purificación de *Lactobacillus sp.* por agotamiento por estría:

Para realizar la purificación de las colonias se tomó de cada una de las placas LD3, LD4, y LD5 las colonias sospechosas, se sembró nuevamente por estrías en placas Petri estériles con agar MRS y se incubó por 24 horas a 37°C. Finalmente se realizó la lectura observándose colonias de bordes regulares, blancas sin pigmentos, circulares, cremosas, convexas y con márgenes enteros de consistencia mucosa coincidiendo con la descripción del género *Lactobacillus*.

Identificación de *Lactobacillus sp.*:

Observación microscópica de *Lactobacillus sp.*:

Para la observación microscópica de las características morfológicas de colonias sospechosas se realizó la tinción de Gram en las placas LD3, LD4 y LD5, que consistió en recoger una muestra estéril con ayuda de un hisopo estéril para hacer el extendido, se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó la muestra al calor (flameando 3 veces aprox.), seguido se agregó azul violeta (cristal violeta), se esperó 1 minuto y se enjuagó con agua, luego se agregó lugol, se esperó 1 minuto y se enjuagó con agua, posteriormente se agregó alcohol y acetona, se esperó 15 segundos y se enjuagó con agua. Finalmente se agregó safranina, se esperó 30 segundos, se enjuagó con agua y se observó al microscopio. Las colonias teñidas de color violeta fueron Gram positivas y las teñidas de color grosella fueron Gram negativas.

Pruebas bioquímicas: A los cultivos puros se les determinó las siguientes características bioquímicas según Bocourt et. al, 2008, Moreno, 2012, Ramírez, 2010 y el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Segunda Edición).

Prueba de la catalasa

Se realizó por el método del portaobjetos con las placas LD3, LD4 y LD5 para lo cual con el asa de siembra se recogió el centro de una colonia pura de 18-24 horas y se colocó sobre un portaobjetos limpio de vidrio. Luego se agregó con un gotero una gota de H₂O₂ al 30% sobre la muestra, posteriormente se observó si hubo o no la formación inmediata de burbujas. Finalmente se desechó el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.

Prueba de la oxidasa

La prueba se realizó haciendo uso de tiras indicadoras Microbiology Bactident® Oxidase la cual da un resultado a partir del viraje de color; en esta prueba se utilizaron colonias correspondientes a las placas LD3, LD4 y LD5; de cada placa se seleccionó dos colonias a las que se le colocó la parte indicadora de cada tira de Microbiology Bactident® Oxidase, se esperó 5 segundos y se observó si hubo o no cambio de color, las tiras de color amarillo indicaron resultado negativo y las que cambiaron a color violeta indicaron resultado positivo.

Producción de gas a partir de la glucosa

Para esta prueba se utilizó las placas LD3, LD4, LD5:

Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en caldo MRS conteniendo 0,2% (v/v) de una solución acuosa de púrpura de bromocresol (0,5%). El medio fue dispensado en tubos colocando 10 ml de caldo con viales invertidos. Después de la inoculación fueron incubados durante 48 h a 37 °C y se realizó la lectura de los resultados observándose si hubo o no la formación de burbuja de gas en los viales como resultado positivo (Bocourt et al., 2008).

Tolerancia a pH ácido

Para esta prueba solo se utilizó la placa LD3 en donde se evaluó el comportamiento de las presuntas colonias de *Lactobacillus sp.* frente a cuatro pH diferentes (3.0, 4.0, 5.0 y 7.0) en 3 ml de caldo MRS, ajustando los pHs con H₂SO₄ 0.1N y con NaOH 1N haciendo uso de las cintas indicadoras de pH; los caldos estériles fueron inoculados con un cultivo axénico y fresco de la placa LD3, hasta tener una turbidez al 0.5 de la escala de Mc Farland (1-2 x 10⁸ UFC/ml). Los caldos se incubaron a 37°C, por 2h y 4h, y después del tiempo establecido se realizó la siembra sobre agar MRS de cada uno de los tubos, se incubó a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia (Moreno, 2012), colocando en un recipiente de plástico con tapa hermética las placas y una vela encendida para así eliminar el oxígeno presente y se selló con cinta adhesiva gruesa. Pasado el período de incubación se realizó la lectura de los resultados.

Tolerancia a tres concentraciones diferentes de NaCl (3.5 %, 4.5% y 5.5%).

Se sembraron las presuntas colonias de *Lactobacillus sp.* de la placa LD3 previamente aisladas, en placas con medio MRS suplementado con tres concentraciones de NaCl (3.5 %, 4.5% y 5.5% p/v) y se compararon contra un control positivo sembrando en medio MRS sin suplementar. Las pruebas se realizaron por triplicado (Ramírez, 2010). Se incubaron las placas a 37°C durante 48 horas y después de dicho tiempo de incubación se realizó la lectura de los resultados.

3.3.2 Confirmación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Para la confirmación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 se realizó el análisis microbiológico siguiendo los pasos del método de ensayo “Microbiología de alimentos y alimentos para animales – Horizontal método para la detección de *Salmonella spp.*” según la ISO 6579. Para ello se utilizó la cepa *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 que pertenece al Laboratorio Referencial de Salud (LARESA) y que se obtuvo por una donación del Instituto Nacional de Salud Perú (INS).

Pruebas bioquímicas

Las colonias seleccionadas se sembraron en los siguientes medios para su confirmación:

Agar TSI: Se sembró la superficie inclinada del agar y la columna. Se incubó a 37 °C ± 1 °C durante 24 h ± 3 h.

Agar de urea: Se sembró la superficie inclinada del agar. Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ y se examinó a intervalos.

Medio de descarboxilación de L-lisina: Se inoculó justo debajo de la superficie del medio líquido. Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Medio Citrato de SIMONS: Se sembró por estría en la superficie del medio de cultivo, y se incubó 24 a 48 horas a 37°C . Observándose el viraje de color de verde a azul para prueba positiva.

Medio para reacción de indol: Se inoculó un tubo que contenía 5 ml del medio triptona / triptófano con la colonia sospechosa. Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Después de la incubación, se agregó 1 ml del reactivo Kovacs.

3.3.3 Confirmación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Para la confirmación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se realizó el análisis microbiológico siguiendo los pasos del método de ensayo “Microbiología de alimentos y piensos - Método horizontal para la enumeración de estafilococos coagulasa - positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies) - Parte 1: Técnica que usa medio de agar Baird-Parker” según la ISO 6888-1. Para ello se utilizó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que pertenece al Laboratorio Referencial de Salud (LARESA) y que se obtuvo por una donación del Instituto Nacional de Salud Perú (INS).

Prueba de coagulasa

Desde la superficie de cada colonia seleccionada, se retiró un inóculo con una aguja estéril y se transfirió a un tubo o frasco de caldo de infusión cerebro-corazón. Se incubó a 35°C o 37°C durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Se agregó aseptícamente 0,1 ml de cada cultivo a 0,3 ml de plasma de conejo en tubos o frascos de hemólisis estériles y se incubó a 35°C o 37°C .

Se inclinó el tubo, y se examinó la coagulación del plasma después de 4h a 6h de incubación y, si la prueba resultó negativa, se volvió a examinar a las 24 h de incubación. Se consideró la prueba de coagulasa como positiva si el volumen de coágulo ocupó más de la mitad del volumen original del líquido.

Como control negativo se agregó 0,1 ml de caldo infusión cerebro-corazón estéril a 0.3 ml de plasma de conejo y se incubó sin inoculación. Para que la prueba fuese válida, el plasma de control no mostró signos de coagulación.

3.3.4 Enfrentamiento de *Lactobacillus* sp. con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Para evaluar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus* sp. aislados a partir del macerado de cebada se trabajó con la placa LD3; de esta placa se tomó parte de una colonia representativa de dicho microorganismo y se sembró por puntura en placas de MRS agar, previamente se marcó con plumón indeleble el lugar donde se sembró por puntura. Luego se agregó a cada placa 5 ml de agar MRS formando así una doble capa para evitar el crecimiento de microorganismos no deseables. Posteriormente se incubó a 37°C por 48 h en microaerofilia.

Al mismo tiempo de la cepa referenciada *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 se realizó un cultivo joven y puro pasando una asada de dicha cepa bioquímicamente confirmada a la superficie inclinada de un tubo que contenía 10 ml de caldo cerebro corazón + agar nutritivo, el cual es el medio empleado para el mantenimiento de las cepas patrón que se manejan en el laboratorio de microbiología del Laboratorio Referencial de Salud (LARESA) y se incubó a

37°C por 6 horas, luego del tiempo de incubación de dicho cultivo se colocó con ayuda de una asa de siembra tres asadas en 5 ml de agua destilada estéril hasta conseguir una turbidez de 0.5 de la escala de Mc Farland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml). Luego, de esta dilución se tomó 1 ml y se mezcló con 5 ml de agar tripticasa soya (TSA) fundido y enfriado a 45°C, todo esto se vertió en la placa de agar MRS previamente inoculado con *Lactobacillus sp.* como se indicó anteriormente.

Así mismo de la cepa referenciada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se realizó un cultivo joven y puro pasando una asada de dicha cepa bioquímicamente confirmada a la superficie inclinada de un tubo que contenía 10 ml de caldo cerebro corazón + agar nutritivo, el cual es el medio empleado para el mantenimiento de las cepas patrón que manejan en el laboratorio de microbiología del Laboratorio Referencial de Salud (LARESA) y se incubó a 37°C por 6 horas, luego del tiempo de incubación de dicho cultivo se colocó con ayuda de una asa de siembra tres asadas en 5 ml de agua destilada estéril hasta conseguir una turbidez de 0.5 de la escala de Mc Farland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml). Luego, de esta dilución se tomó 1 ml y se mezcló con 5 ml de agar tripticasa soya (TSA) fundido y todo esto se vertió en la placa de agar MRS previamente inoculado con *Lactobacillus sp.* como se indicó inicialmente.

Se realizaron un total de tres repeticiones en las que se enfrentó *Lactobacillus sp.* con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, reportando los resultados a partir de las medidas de los halos de inhibición formados en centímetros.

Control positivo y control negativo de la prueba:

Para tener un control positivo de la prueba se preparó el inóculo realizando en 5 ml de solución salina fisiológica una suspensión de colonias seleccionadas de un cultivo de 18 a 24 horas de incubación del microorganismo patógeno *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Esta suspensión se ajustó a la escala de 0.5 de Mc Farland conteniendo aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/ml; 15 minutos después de ajustado el inóculo se sembró en agar Mueller Hinton con un hisopo estéril, presionando el hisopo contra las paredes del tubo por encima del nivel de líquido a fin de escurrir el exceso de inóculo. Se inoculó la superficie seca de agar Mueller Hinton por hisopado en tres direcciones rotando la placa 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo. Como paso final se hisopó la circunferencia de la placa. De esta manera se obtuvieron zonas de inhibición uniformemente circulares y desarrollo homogéneo.

Posteriormente se dejó secar la placa petri por 3 minutos antes de aplicar los discos de gentamicina, para que el exceso de humedad superficial sea absorbido. Se colocaron los discos sobre la superficie del agar inoculada con ayuda de una pinza estéril, un total de 6 discos de gentamicina para antibiograma. El mismo procedimiento se realizó para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 obteniéndose así dos placas para el control positivo. Se incubaron las placas invertidas a 35 ± 2 °C, finalmente después de 18 horas de incubación se examinó cada placa y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición en milímetros (Malbran, 2019).

Como control negativo se inoculó con ayuda de una aguja de siembra agua destilada estéril en diferentes puntos de una placa petri conteniendo agar MRS y a la cual se le añadió 5 ml de Agar Tripticasa Soya (TSA) fundido y enfriado a 45°C, previamente inoculado con el microorganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y se incubó a 37°C durante 24 horas.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

Luego de la identificación y las pruebas bioquímicas de *Lactobacillus sp.* aislados a partir del macerado de cebada, se consideró que las cepas de las placas LD3, LD4 y LD5 correspondieron a *Lactobacillus delbrueckii*, ya que dicho microorganismo presenta un perfil bioquímico similar a las bacterias que se aislaron; son bacilos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativo, productores de ácido láctico, con un rango de crecimiento que oscila entre mesófilos a termófilos tolerando temperaturas superiores a los 45°C (comprobado en la etapa de maceración de la preparación del macerado de cebada), son anaerobios capaces de tolerar y desarrollarse en medios aeróbicos, homofermentadores obligados que metabolizan la lactosa y ácido láctico por la vía EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) con producción de 90-97% de ácido láctico a partir de la glucosa (Angulo et al., 2018). Además, son bacterias lácticas que se pueden aislar a partir de la preparación del macerado de cebada según Tito y Viloche, 2009.

- **Enfrentamiento de *Lactobacillus sp.* con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923:**

Tabla 4.1.1: Resultado de la medida de los halos de inhibición formados después de realizar el enfrentamiento de *Lactobacillus sp.* con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Prueba	Microorganismo antagónico	Microorganismo indicador (patógeno)	Medida del halo de inhibición (cm)
Prueba 01	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	1.6
	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2.7
Prueba 02	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	2.1
	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1.6
Prueba 03	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	1.5
	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2.0

En los gráficos mostrados a continuación se observa la medida de los halos de inhibición que se formaron después de realizado el enfrentamiento de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en cada una de las pruebas realizadas. Así mismo se observa en los gráficos 4.1.1 y 4.1.3 un resultado similar donde la medida de los halos de inhibición formados sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fueron de mayor medida que los halos formados sobre *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; mientras que en el gráfico 4.1.2 sucede lo contrario observándose un halo de inhibición de mayor medida sobre *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Finalmente, el gráfico 4.1.4 presenta la comparación de las medidas de los halos de inhibición formados en las tres pruebas realizadas para cada uno de los patógenos.

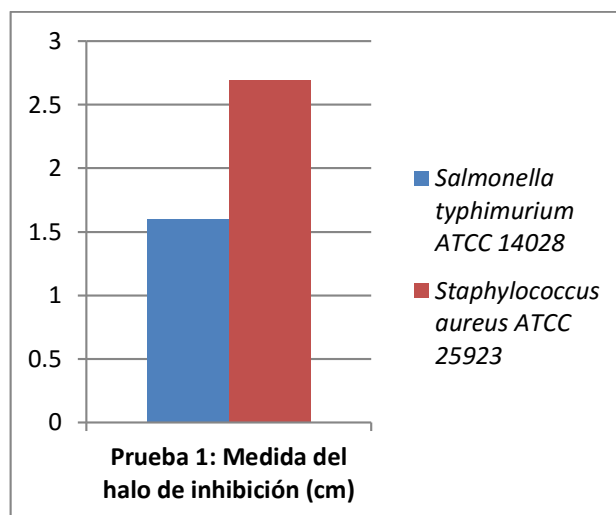


Gráfico 4.1.1: Prueba 01 del enfrentamiento de *Lactobacillus sp.* con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 con un halo de inhibición de 1.6 cm y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con un halo de inhibición de 2.7 cm.

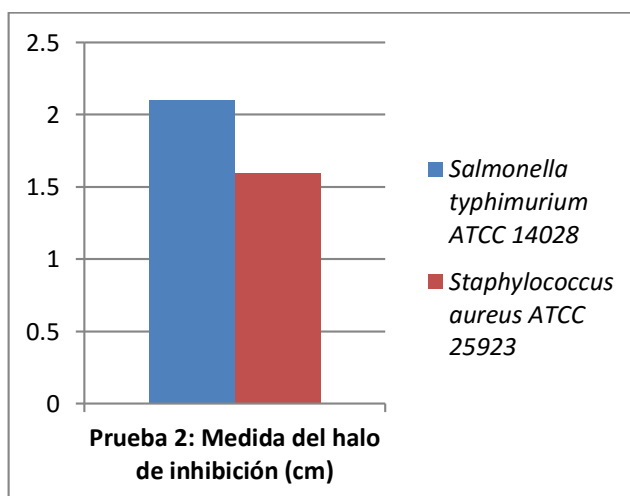


Gráfico 4.1.2: Prueba 02 del enfrentamiento de *Lactobacillus sp.* con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 formando un halo de inhibición de 2.1 cm y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 formando un halo de inhibición de 1.6 cm.

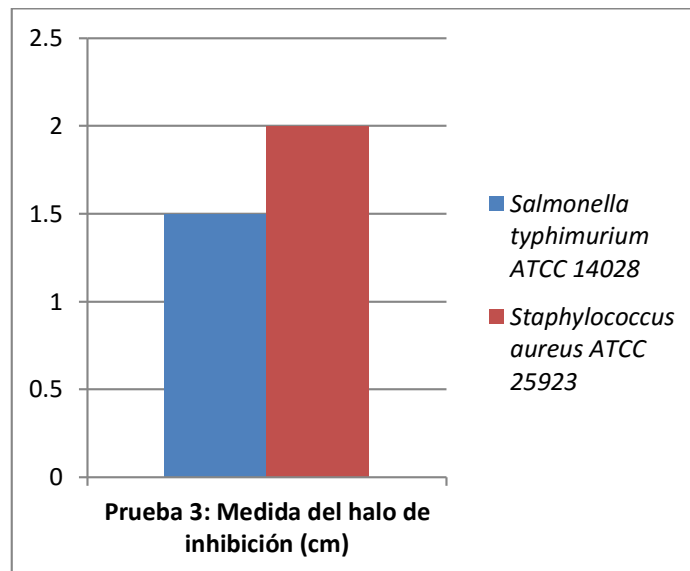


Gráfico 4.1.3: Prueba 03 del enfrentamiento de *Lactobacillus sp.* con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 formando un halo de inhibición de 1.5 cm, y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 formando un halo de inhibición de 2.0 cm.

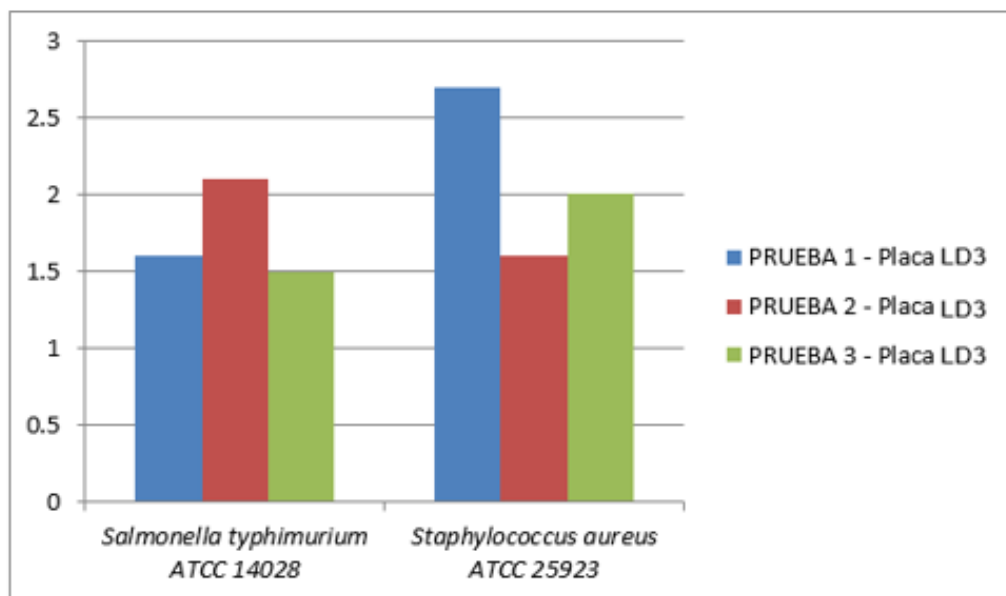


Gráfico 4.1.4: Comparación de la medida de los halos de inhibición (cm) formados luego de realizar el enfrentamiento de *Lactobacillus sp.* con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 respectivamente.

▪ **Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* sp.**

Para el aislamiento e identificación de *Lactobacillus* sp. se preparó inicialmente el macerado de cebada a partir del cual se obtuvieron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-5} , luego se aisló en cultivo puro en medio agar MRS, posteriormente se realizó la observación microscópica por tinción de Gram y se realizaron las pruebas bioquímicas: prueba de catalasa, oxidasa, producción de gas a partir de glucosa, tolerancia a pH ácido y tolerancia a tres concentraciones diferentes de NaCl, observándose los siguientes resultados:

Tabla 4.1.2: Aislamiento de *Lactobacillus* sp. a partir de macerado de cebada.

Dilución \ Resultado	Placa 1 (ufc/ml)	Placa 2 (ufc/ml)
10^{-1}	MNPC	MNPC
10^{-2}	MNPC	MNPC
10^{-3}	274×10^3	243×10^3
10^{-4}	59×10^4	62×10^4
10^{-5}	7×10^5	9×10^5

*MNPC (Muy numeroso para contar): >300 colonias por placa.

Tabla 4.1.3: Resultado de la tinción de Gram de las placas LD3, LD4 y LD5 por duplicado.

Placa	GRAM
LD3	(+)
LD3	(+)
LD4	(+)
LD4	(+)
LD5	(+)
LD5	(+)

Tabla 4.1.4: Resultado de la prueba de la catalasa utilizando peróxido de hidrogeno al 30% (H_2O_2) en las placas LD3, LD4 y LD5.

Placa	Catalasa
LD3	(-)
LD4	(-)
LD5	(-)

Tabla 4.1.5: Resultado de la prueba de la oxidasa realizada haciendo uso de tiras indicadoras Microbiology Bactident® Oxidase en las placas LD3, LD4 y LD5.

Placa	Oxidasa
LD3	(-)
LD4	(-)
LD5	(-)

Tabla 4.1.6: Resultado de la prueba de producción de gas a partir de glucosa en las placas LD3, LD4, y LD5 (duplicado).

Muestra	Producción de gas
LD3	(-)
LD3	(-)
LD4	(-)
LD4	(-)
LD5	(-)
LD5	(-)

Tabla 4.1.7: Resultado de la prueba de tolerancia a pH ácido en la placa LD3.

pH TIEMPO	3.0	4.0	5.0	7.0
2 horas	0 ufc	24 ufc	235 ufc	0
4 horas	0 ufc	0 ufc	150 ufc	0

Tabla 4.1.8: Resultado de la prueba tolerancia a tres concentraciones diferentes de NaCl (3.5 %, 4.5% y 5.5%) en la placa LD3.

Medio Muestra	Agar MRS 3.5% NaCl p/v	Agar MRS 4.5% NaCl p/v	Agar MRS 5.5% NaCl p/v	Agar MRS sin suplementar (control positivo)
LD3	0 Ufc	0 Ufc	0 Ufc	MNPC
LD3	0 Ufc	0 Ufc	0 Ufc	
LD3	0 Ufc	0 Ufc	0 Ufc	

*MNPC (Muy numeroso para contar): >300 colonias por placa.

▪ Verificación de la cepa *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Para la verificación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, se realizaron pruebas bioquímicas y siembra en medio de cultivo sólido agar BPLS, agar SS y agar XLD, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 4.1.9: Confirmación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 por pruebas bioquímicas.

Prueba bioquímica	Resultado
Agar TSI/H ₂ S	K/A ^{+/++}
Agar LIA/H ₂ S	K/K ^{+/++}
Medio de Citrato de SIMONS	Positivo
Agar de Urea	Negativo
Medio SIM (sulfuro, indol, motilidad)	Sulfuro (positivo) Indol (negativo) Motilidad (positivo)

Tabla 4.1.10: Confirmación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 en medio de cultivo sólido.

Medio de cultivo	Características de las colonias
Agar BPLS	Colonias rojas
Agar Salmonella - Shiguelia (SS)	Colonias de color beige con centros blancos
Agar XLD	colonias rojas con centros de color negro

▪ **Verificación de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Para la verificación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, se realizó la prueba de la coagulasa y siembra en medio de cultivo sólido agar Baird Parker, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 4.1.11: Confirmación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por la prueba de la coagulasa.

Prueba bioquímica	Resultado
Prueba de la coagulasa	Positivo

Tabla 4.1.12: Confirmación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en medio de cultivo agar Baird Parker.

Medio de cultivo	Características de las colonias
Baird-Parker Agar	Colonias brillantes, de tamaño mediano y color de gris oscuro a negro; halos transparentes alrededor de las colonias.

▪ **Control positivo**

Se realizó un control positivo donde se sembró por separado los patógenos *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en placas con agar Mueller Hinton, y se colocaron discos de gentamicina para antibiograma, obteniéndose como resultado que ambos microorganismos fueron sensibles (≥ 15 mm) a dicho antibiótico, debido a que se observó que las medidas de los halos de inhibición formados estuvieron por encima de los 20 mm.

Tabla 4.1.13: Medida de los halos de inhibición (mm) del control positivo.

Medio sólido	Antibiótico	Microorganismo patógeno	Medida de halo (mm)	Interpretación
Agar Mueller Hinton	Disco de gentamicina para antibiograma	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	22	Sensible (≥ 15 mm)
			22	
			24	
			26	
			25	
			27	
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20	Sensible (≥ 15 mm)
			23	
			22	
			24	
			23	
			21	

4.2 DISCUSIÓN

La parte fundamental del grano de cebada es el embrión que, bajo condiciones favorables de temperatura y de humedad, germina formando raíces y tallo. El endospermo ocupa la mayor parte del grano y constituye la reserva alimenticia de la planta (almidón), la cual será posteriormente la fuente de azúcares del mosto. Sin embargo, la levadura no puede metabolizar este almidón, ya que posee una estructura formada por cadenas complejas de azúcares. Por este motivo debe ocurrir una transformación previa del almidón a azúcares sencillos (glucosa, maltosa y maltotriosa), tal proceso se realiza en el macerado del grano, que consiste en poner la malta en remojo a cierta temperatura para favorecer la acción de diferentes enzimas (Chauca, 2015).

Tal como menciona Chauca, 2015, la cebada (*Hordeum vulgare*) bajo condiciones favorables de temperatura y humedad germinó haciendo que el grano que contenía almidón sea la fuente de azúcares que posteriormente se transformaron en azúcares sencillos en el mosto; del macerado de cebada se pudo aislar la bacteria ácido láctica *Lactobacillus delbrueckii*, la cual tiene actividad antimicrobiana ya que produce ácido láctico principalmente y otros productos resultado de la fermentación que realiza, el ácido láctico generado hace que el ambiente sea ácido con un pH por debajo del pH óptimo para el crecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

La descripción general ubica a las BAL en el grupo de las bacterias Gram positivas, siendo la mayoría bacilos delgados Gram positivos que se pueden presentar unidos en cadenas largas (Ramírez, 2010).

Como señala Ramírez, 2010, las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* son Gram positivas, durante la observación microscópica después de realizar la tinción de Gram se observaron cadenas cortas de bacilos Gram positivos y junto a estos microorganismos se observó algunos bastones teñidos de color grosella lo cual podría indicar la presencia de bacterias Gram negativas presentes en dicha muestra, esto puede deberse a que solo las células muertas de *Lactobacillus* pueden dar resultados variables a la tinción de Gram; después de realizar la observación microscópica y las pruebas bioquímicas se pudo identificar a dichas bacterias con perfil bioquímico de *Lactobacillus delbrueckii*.

La actividad antimicrobiana principal de las BAL se debe a la producción de ácido láctico, ácido acético, CO₂, H₂O₂, acetaldehído, entre otros. El ácido acético y propiónico producidos a través de la vía heterofermentativa, pueden interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas; estos compuestos antimicrobianos son más efectivos que el ácido láctico debido a los elevados valores de pKa (ácido láctico 3.08, ácido propiónico 4.87 y ácido acético 4.75), por lo tanto, tienen un mayor rango de actividad antimicrobiana contra levaduras, mohos y bacterias. El crecimiento de *S. typhimurium* se reduce cuando se utiliza a los ácidos láctico y acético combinados, lo que demuestra su actividad sinérgica (Bustamante y Alvarado, 2015).

Se logró aislar *Lactobacillus delbrueckii* con capacidad inhibitoria frente a las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 respectivamente, a partir del macerado de cebada (ver tabla 4.1.12) como resultado de la producción del ácido láctico el cual a pesar de tener un valor de pKa mucho menor al de otros ácidos hace que el ambiente sea ácido y hostil; y aun así tenga la capacidad de actuar como un compuesto antimicrobiano inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos como el caso de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 que se comprobó con la formación de halos de inhibición de 1.5, 1.6 y 2.1 cm de diámetro producto del enfrentamiento de ambos microorganismos.

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), por su lado, es producido en presencia de oxígeno por las BAL a través de la acción de flavoproteína oxidasa o NADH peroxidasa y su efecto antimicrobiano se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilo causando la desnaturalización de enzimas, el H₂O₂ producido por *Lactobacillus* y *Lactococcus* es capaz de inhibir cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. y varios microorganismos psicrótrofos en alimentos (Bustamante y Alvarado, 2015).

A partir de los resultados obtenidos inferimos que las colonias de *Lactobacillus sp.* aisladas del macerado de cebada presentaron perfil bioquímico de *Lactobacillus delbrueckii* el cual es un homofermentador obligado que metaboliza la lactosa y ácido láctico por la vía EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) con producción de 90-97% de ácido láctico a partir de la glucosa según Angulo et al., 2018, y que además de producir ácido láctico como principal producto de fermentación también produce otros compuestos antimicrobianos como el peróxido de hidrogeno; según las investigaciones existentes el peróxido de hidrogeno actúa negativamente frente a *Staphylococcus aureus* ya que genera desnaturalización de enzimas y peroxidación de las membranas lipídicas aumentando la permeabilidad de la membrana del microorganismo patógeno, esto sumado con la disminución del pH generada por el ácido láctico, hace que tenga actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comprobándose mediante la formación de halos de inhibición de 1.6, 2.0 y 2.7 cm de diámetro producto del enfrentamiento de ambos microorganismos.

Actualmente se utilizan varios medios de cultivo, tanto selectivos como diferenciales, para el aislamiento y recuento de BAL a partir de alimentos, entre los que se encuentran el agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe), el agar APN (Actidiona, polimixina, nitrito), el agar Lee y el agar de Chalmers. (Ortiz, 2006).

Como indica el autor, el agar MRS es un medio de cultivo sólido selectivo, utilizado para el aislamiento y recuento de bacterias ácido lácticas, especialmente del género *Lactobacillus*, compuesto por proteosa peptona, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa los cuales son nutrientes que proporcionan la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales necesarios para su crecimiento. Además, como ya se ha mencionado la glucosa es la fuente de energía a partir de la cual se produce ácido láctico como producto principal de la fermentación homoláctica que realiza *Lactobacillus delbrueckii*, así mismo este medio contiene cofactores indispensables en el metabolismo como sales de sodio, magnesio y manganeso, y presenta en menor cantidad monoleato de sorbitán y citrato de amonio los cuales actúan inhibiendo el desarrollo de la flora acompañante, en especial bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, proporcionando el carácter selectivo de este agar. En consecuencia, esta inhibición se logra por la producción de ácido láctico principalmente pero también por la constitución del medio de cultivo ya que en el caso de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 requiere de un medio mucho más selectivo con adición de otras sustancias como desoxicolato sódico, tiosulfato de sodio y citrato amónico férrico además de peptonas, lactosa, sacarosa principalmente y en el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 requieren de un medio que contenga peptona de caseína y extracto de carne para utilizarlo como fuente de carbono y nitrógeno además de glicina y piruvato de sodio para estimular el crecimiento de dicho microorganismo.

Las BAL son consideradas seguras y se utilizan en muchos países en la producción de alimentos fermentados. Por esta razón son sumamente atractivas como herramientas para controlar el crecimiento de patógenos en una gran variedad de alimentos. (Colello et al., 2017).

Por lo investigado en la región no existen estudios del aislamiento de *Lactobacillus sp.* a partir de alimentos de origen vegetal como la cebada que frente a patógenos como *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 generen inhibición de su crecimiento; como menciona el autor, estos microorganismos positivos para el ser humano a futuro se podrían emplear o adicionar en los insumos utilizados para la preparación de alimentos de consumo diario o al alimento preparado directamente y dar un valor agregado, mejorando los procesos, aumentando la estabilidad y el tiempo de conservación de los alimentos que son para los seres humanos finalmente.

CONCLUSIONES

Se determinó el efecto inhibitorio de *Lactobacillus delbrueckii* sobre el crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por la formación de halos de inhibición los cuales tuvieron una medida máxima de 2.1 y 2.7 cm respectivamente.

Se aisló *Lactobacillus delbrueckii* en cultivo puro a partir de la preparación de macerado de cebada.

Se verificó a partir de pruebas bioquímicas y siembra en medio sólido que las cepas con las que se trabajó eran cepas referenciadas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Se determinó el efecto inhibitorio de *Lactobacillus delbrueckii* sobre el crecimiento de las bacterias patógenas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

RECOMENDACIONES

A las autoridades competentes de las instituciones encargadas de salud pública, promover la investigación del efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de microorganismos patógenos nocivos para la salud.

A los profesionales de la salud e investigadores interesados, enfatizar en el estudio de los alimentos tanto de origen animal como vegetal, de los cuales se pueda aislar bacterias lácticas que presenten efectos antimicrobianos.

A las autoridades pertinentes, que proporcionen a las instituciones de salud pública el material biológico necesario como cepas de referencia para una mejor investigación sobre los efectos de las bacterias lácticas frente a microorganismos patógenos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGULO, L., BRAVO, A., CORONADO, M., DE FARIA, Y., DE LA ROSA, O., DE FARIA, Y., MÁRQUES, A., MELÉNDEZ, B., RAMIS, C., RODRÍGUEZ - ROMÁN, E., SERRANO, A., TROMP, J Y VÁZQUEZ, B. (2018). Aislamiento e identificación molecular de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus* en leche de cabra (*Capra hircus*). Rev. Fac. Cs. Vets. Universidad Central de Venezuela (UCV), 59(1) 18-27. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/331162156_Aislamiento_e_identificacion_molecular_de_una_cepa_de_Lactobacillus_delbrueckii_subespecie_bulgaricus_en_leche_de_Cabra_Capra_hircus. [accesado el 16 de junio de 2019].

BENITES, C. (2015). Efecto in vitro del sobrenadante de cultivos de *Lactobacillus sp.* aislados de leche materna, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* Tesis. Título de Microbiólogo y Parasitólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Repositorio ALICIA.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. (2004). The Proteobacteria. Disponible en: <https://www.springer.com/gb/book/9780387950402> [accesado el 06 de mayo de 2018].

BOCOURT, R., MILIÁN, G., LAURENCIO, M., PÉREZ, M., RANILLA, M., RODRÍGUEZ, S., RONDÓN, A. Y SAMANIEGO, L. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus sp.* procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria, 6(1) 56-63. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/11358120809487628> [accesado el 06 de mayo de 2018].

BUSTAMANTE, G. Y ALVARADO, P. (2015). Efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus sp.* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*, Revista Científica de Estudiantes REBIOLEST; 1(3): e41. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/893/822> [accesado el 06 de mayo de 2018].

CHAUCA, G. (2015). Automatización del proceso de maceración en la elaboración de cerveza artesanal. Tesis. Título Profesional de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima, Perú. Disponible en: http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/3618/1/chauca_lg.pdf [accesado el 25 de agosto de 2018].

COLELLO, R., ETCHEVERRÍA, A., PADOLA, N., Y RUIZ, M. (2017). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus spp.* sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. Revista Argentina de Microbiología, 49(2), 174-177. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S032575411630116X> [accesado el 06 de mayo de 2018].

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 6579:2002 (E), Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.* Fourth edition 2002-07-15. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:6579:ed-4:v1:en> [accesado el 25 de abril de 2018].

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 6888-1:1999, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase – positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:6888:-1:ed-1:v1:en> [accesado el 25 de abril de 2018].

KHALIL, I. (2016). Isolation, Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Milk and Yoghurts Md. Research & Reviews: Journal of Food and Dairy Technology, 4(3), 17-26. Disponible en: <http://www.rroij.com/open-access/isolation-identification-and-characterization-of-lactic-acid-bacteriafrom-milk-and-yoghurts-.pdf> [accesado el 25 de abril de 2018].

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J. M. Y PARKER, J. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos. Disponible en: https://drive.google.com/file/d/0B18Dbg_Hy175aXITakdlUF9pOG8/view [accesado el 25 de abril de 2018].

MALBRAN, C. G. (2019). Método de determinación de sensibilidad Antimicrobiana por difusión. Servicio Antimicrobianos-INEI-ANLIS. Buenos Aires, Argentina.

MORENO, L. (2012). Aislamiento y Selección de *Lactobacillus sp* con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Tesis de posgrado. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/8647/1/lizethjohannamorenogalarza.2012.pdf> [accesado el 25 de abril de 2018].

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD – OMS. (2015). Informe Estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/200047/WHO_FOS_15.02_spa.pdf;jsessionid=6C1A6F8F67C3EC8106BCA5695C78E4CA?sequence=1 [accesado el 25 de abril de 2018].

ORTIZ, M. (2006). Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el Estado de Hidalgo. Tesis. Título de Químico en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Disponible en: <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10741/Identificacion%20bioquimica.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [accesado el 5 de abril de 2019].

RAMÍREZ, F. (2010). Aislamiento de bacterias *Lactobacillus sp* y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagonista in vitro. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8624/tesis584.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [accesado el 04 de abril de 2018].

RODRÍGUEZ, I. (2010). Efecto de la concentración de bacteriocinas de probióticos aislados de quesos preparados artesanalmente en la región la libertad, sobre el crecimiento de bacterias patógenas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Trujillo. Repositorio ALICIA.

RODRÍGUEZ, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España. Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3931/mrg1del1.pdf> [accesado el 25 de abril de 2018].

TITO, C. Y VILOCHE, J. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus* nativos de productos de fermentación en la ciudad de Tacna. Revista Ciencia & Desarrollo, 11, 61-66. Disponible en: revistas.unjbg.edu.pe/index.php/CYD/article/download/200/177 [accesado el 11 de marzo de 2018].

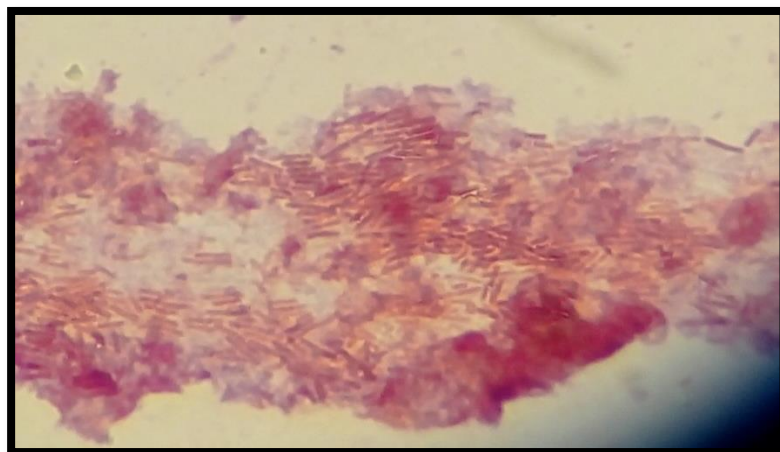
TORRES, V. (2013). Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* contra *Salmonella sp.*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. Título de Química de Alimentos. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2155/1/T-UCE-0008-14.pdf> [accesado el 11 de julio de 2018].

ANEXOS

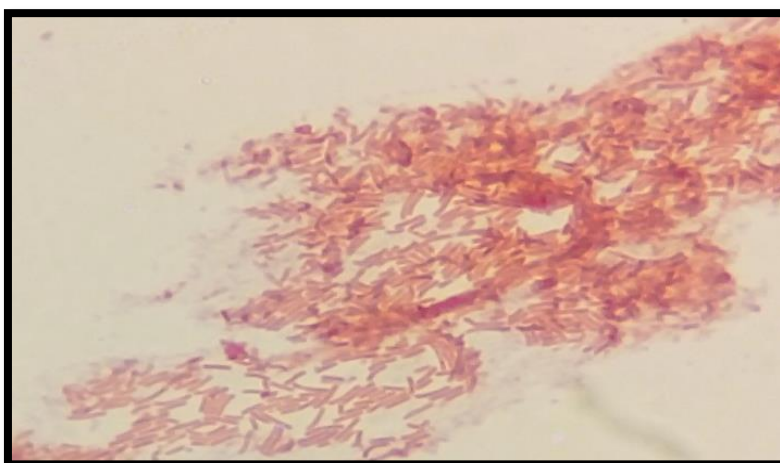
Anexo 01: Preparación del macerado de cebada.



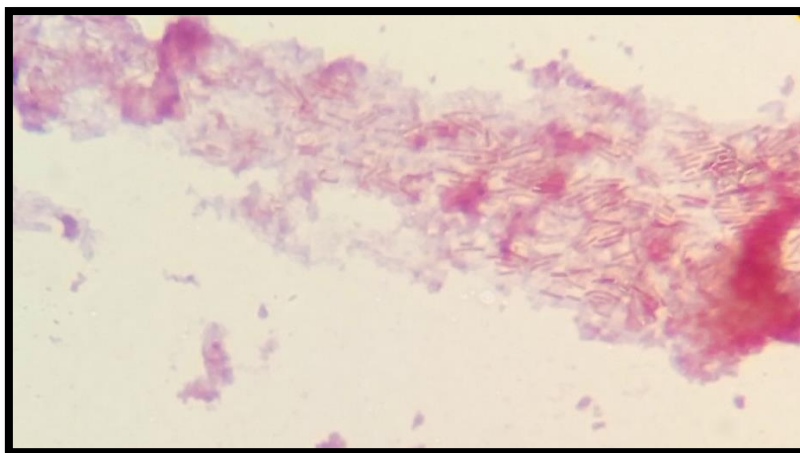
Anexo 02: Observación de bacilos Gram positivos después de realizar la tinción de Gram de colonias de las placas LD3 (a), LD4 (b) y LD5 (c).



(a)



(b)



(c)

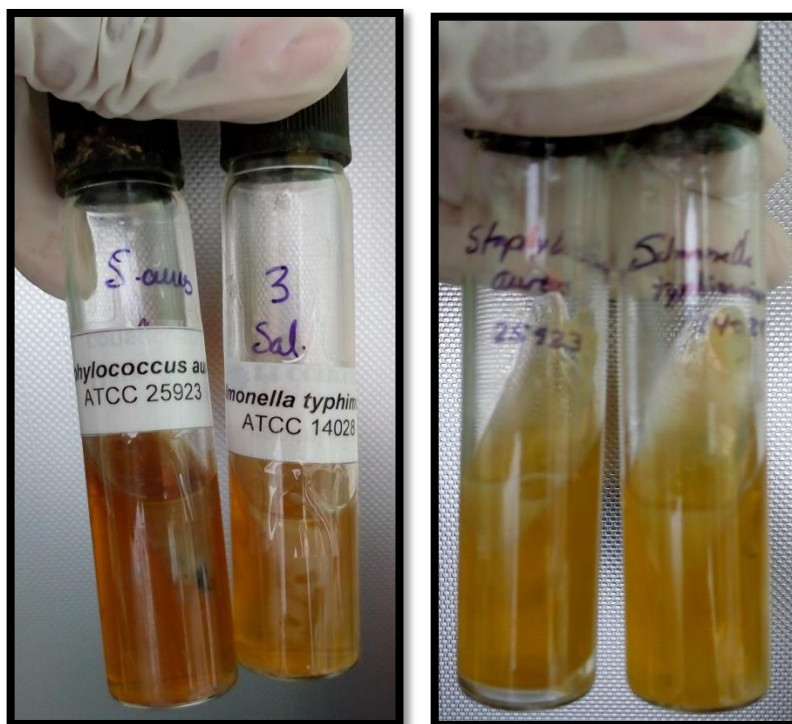
Anexo 03: Observación de la placa LD3 de *Lactobacillus sp.* en medio sólido agar MRS a partir del macerado de cebada.



Anexo 04: Comparación de las colonias de *Lactobacillus sp.* en agar MRS aisladas de macerado de cebada de la presente investigación (Izquierda) con la observación de colonias características de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aisladas en leche de cabra procedente de la Unidad Experimental de Caprinos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela (Angulo et al., 2018) (Derecha).



Anexo 05: Cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 del Laboratorio Referencial de Salud (LARESA).

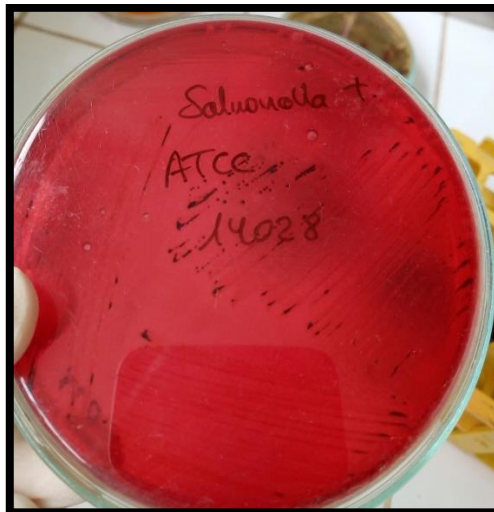


Anexo 06: Confirmación bioquímica de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.





Medio sólido agar BPLS

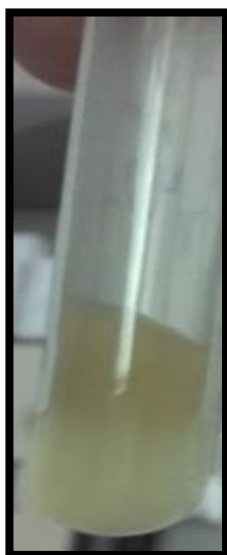


Medio sólido agar XLD



Medio sólido agar Salmonella - Shiguella (SS)

Anexo 07: Confirmación bioquímica de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

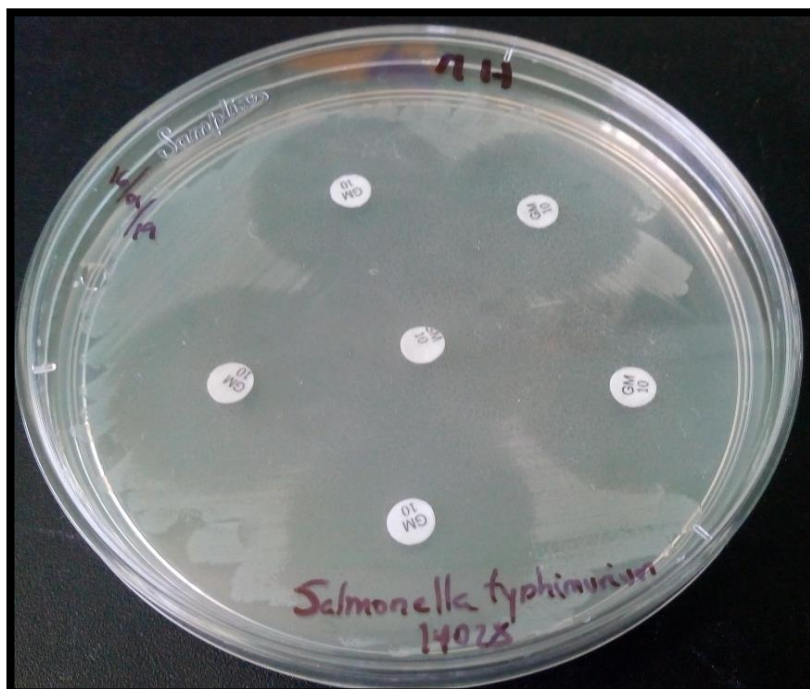


Prueba de la coagulasa

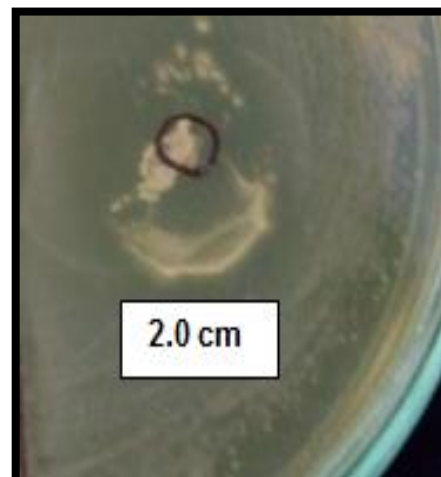
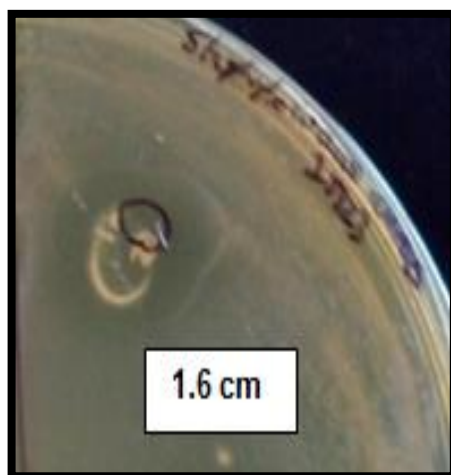
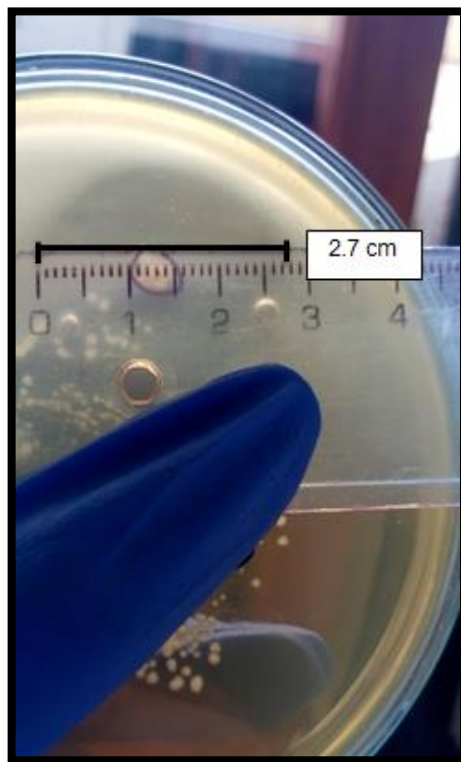


Medio sólido agar Baird Parker

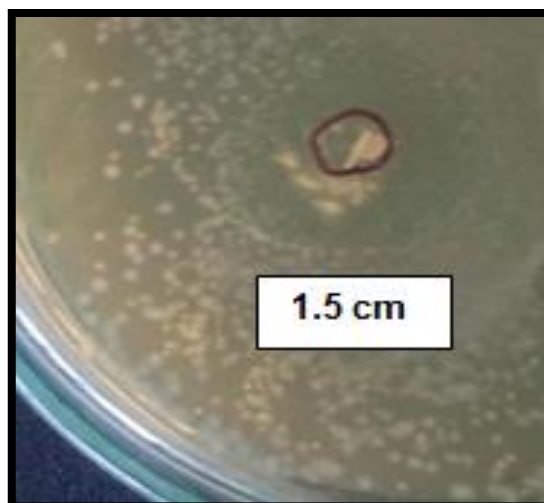
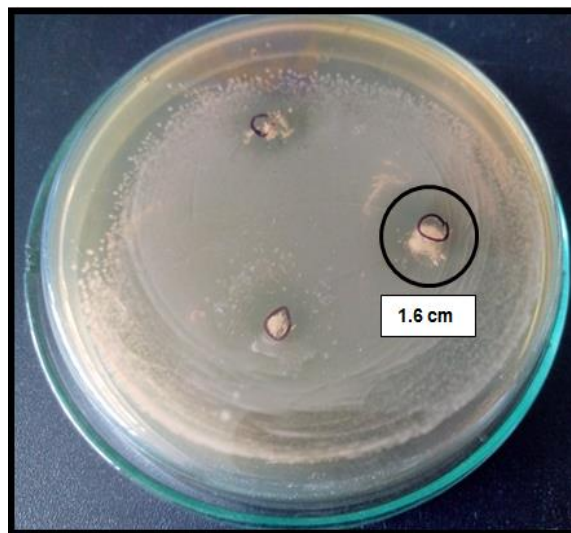
Anexo 08: Control Positivo utilizando los patógenos *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en agar Mueller Hinton con discos de gentamicina para antibiograma.



Anexo 09: Enfrentamiento de *Lactobacillus* sp. con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Anexo 10: Enfrentamiento de *Lactobacillus* sp. con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.



Anexo 11: Fórmula del medio Agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) para el aislamiento de *Lactobacillus sp.*

FORMULA IN g/l			
Dextrose	20.00	Ammonium Citrate	2.00
Bacteriological Peptone	10.00	Tween 80	1.00
Beef Extract	8.00	Magnesium Sulfate	0.20
Sodium Acetate	5.00	Manganase Sulfate	0.05
Yeast Extract	4.00	Bacteriological Agar	10.00
Dipotassium Phosphate	2.00		
Final pH 6.2 ± 0.2 at 25°C			

Anexo 12: Fórmula del medio Agar Baird Parker para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

FÓRMULA (en gramos por litro)	
PEPTONA DE CASEÍNA.....	10.0
EXTRACTO DE CARNE.....	5.0
EXTRACTO DE LEVADURA.....	1.0
CLORURO DE LITIO.....	5.0
GLICINA.....	12.0
PIRUVATO DE SODIO.....	10.0
AGAR.....	17.0
pH FINAL: 6.8 ± 0.2	

Anexo 13: Fórmula del medio Agar Salmonella Shiguelia para el aislamiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

FÓRMULA	
PLURYPEPTONA.....	5.0 g
EXTRACTO DE CARNE.....	5.0 g
LACTOSA.....	10.0 g
MEZCLA DE SALES BILIARES.....	8.5 g
CITRATO DE SODIO.....	8.5 g
TIOSULFATO DE SODIO.....	8.5 g
CITRATO FÉRRICO.....	1.0 g
VERDE BRILLANTE.....	0.00033 g
ROJO NEUTRO.....	0.025 g
AGAR.....	13.5 g
AGUA PURIFICADA.....	1000 ml
pH FINAL: 7.0 ± 0.2	

